

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/001991

International filing date: 03 February 2005 (03.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-34019
Filing date: 10 February 2004 (10.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 March 2005 (24.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

03. 2. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 2 月 1 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 3 4 0 1 9
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 4 - 0 3 4 0 1 9]

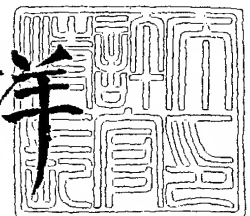
出 願 人 独 立 行 政 法 人 科 学 技 術 振 興 機 構
Applicant(s):

2 0 0 5 年 3 月 1 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川

洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 NP03454-YS
【提出日】 平成16年 2月10日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
 【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 1 0 条西 1 丁目 北 1 0 条グランドハイツ 4
 0 2
 【氏名】 紙谷 浩之
【発明者】
 【住所又は居所】 北海道札幌市北区新琴似 7 条 1 丁目 3 番 3 5 - 7 0 1
 【氏名】 原島 秀吉
【発明者】
 【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 1 3 条西 1 丁目 3 - E 1 0 1 1
 【氏名】 土谷 博之
【特許出願人】
 【識別番号】 503360115
 【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代理人】
 【識別番号】 100093230
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 西澤 利夫
 【電話番号】 03-5778-0201
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 009911
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0316415

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

細胞内の標的DNA配列の 1 または複数個の塩基を変換する方法であって、標的DNA配列と相同であり、かつ変換すべき塩基を含む300～3,000塩基の一本鎖DNA断片を細胞内に導入することを特徴とするDNA配列の塩基変換方法。

【請求項 2】

一本鎖DNA断片が、標的DNA配列のセンス鎖と相同である請求項 1 の方法。

【請求項 3】

細胞内の標的DNA配列が、その 1 または複数個の塩基によって疾患の原因となっているDNA配列である請求項 1 または 2 の方法。

【請求項 4】

生物体内細胞の標的DNA配列の 1 または複数個の塩基を変換する請求項 1 から 3 のいずれかの方法。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれかの方法によって、標的DNA配列の 1 または複数個の塩基が変換された細胞。

【請求項 6】

請求項 5 の細胞を体内に保有する生物個体。

【請求項 7】

標的DNA配列の 1 または複数個の塩基の変換が原因となっている疾患を治療するための薬剤であって、標的DNA配列に相補的であり、かつ変換すべき塩基を含む300～3,000塩基の一本鎖DNA断片が細胞内に導入可能な形態を有する治療薬剤。

【請求項 8】

標的DNA配列の 1 または複数個の塩基の変換が原因となっている疾患を治療する方法であって、標的DNA配列に相補的であり、かつ変換すべき塩基を含む300～3,000塩基の一本鎖DNA断片を細胞内に導入することを特徴とする治療方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】DNA配列の塩基変換方法

【技術分野】

【0001】

この出願の発明は、DNA配列の塩基変換方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、細胞内の標的DNA配列の1または複数個の塩基または塩基配列を他の塩基または塩基配列に変換する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年のヒトゲノム計画の進展や大量遺伝子サンプルのスクリーニング方法の開発によって、個人の遺伝子情報がより詳細かつ簡便に調べることが可能になった（非特許文献1、2）。このような技術の進歩と共に、個々の患者の遺伝子情報に合わせて、変異の入った配列を直接正常な配列に戻す遺伝子修復法は、遺伝子治療におけるテーラーメイド医療として、非常に期待できる技術である。この遺伝子修復法の一つであるSmall Fragment Homologous Replacement (SFHR) 法は、正常遺伝子配列を含む、熱変性させたPCR産物（二本鎖DNA断片）を細胞へ導入することによって、変異遺伝子を正常型へ変換することを目的としている（非特許文献3-5）。これまでこの方法によって、嚢胞性線維症や筋ジストロフィーなどの原因遺伝子を修復できることが報告されてきた（非特許文献6、7）。このように修復された遺伝子は、正常遺伝子と同様に本来のプロモーターの制御下で、細胞内で適切に発現されることが期待できる。また、これまでの遺伝子治療では難しいとされてきた癌遺伝子に代表されるような機能獲得性変異も、原理的に治療・修復することが可能である。

【0003】

また、一本鎖DNA断片を用いる遺伝子修復方法としては、末端修飾オリゴヌクレオチドを用いた方法が知られている。これは、両末端をホスホロチオエート（非特許文献8-11）や2'-O-Me-RNA（非特許文献12-14）、さらにはLNA（Locked nucleic acid）（非特許文献15）で修飾した25~100塩基の一本鎖DNAを用いて、哺乳動物細胞と酵母においてそれぞれ 10^{-2} 、 10^{-5} の修復効率を示すことが報告されている。またこの末端修飾オリゴヌクレオチドを用いた方法では、標的DNA配列のアンチセンス鎖と相同の一本鎖DNA断片を用いたときに、より高い遺伝子修復効率を示すことが知られている（非特許文献8、12）。

【非特許文献1】Joos L, Eryusel E and Brutsche MH. Functional genomics and gene microarrays-the use in research and clinical medicine. Swiss Med Wkly. 2003;133:31-38.

【非特許文献2】Ferrari M, Stenirri S, Bonini P, Cremonesi L. Molecular diagnostics microelectronic microchips. Clin Chem Lab Med. 2003;41:462-467.

【非特許文献3】Kunzelmann K, Legendre J-Y, Knoell DL, Escobar LC, Xu Z and Gruenert DC. Gene targeting of CFTR DNA in CF epithelial cells. Gene Ther. 1996;3:859-867.

【非特許文献4】Goncz KK, Kunzelmann K, Xu Z and Gruenert DC. Targeted replacement of normal and mutant CFTR sequences in human airway epithelial cells using DNA fragments. Hum Mol Genet. 1998;7:1913-1919.

【非特許文献5】Colosimo A, Goncz KK, Novelli G, Dallapiccola B and Gruenert DC. Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments. Mol Ther. 2001;3:178-185.

【非特許文献6】Goncz KK, Colosimo A, Dallapiccola B, Gagne L, Hong K, Novelli G, Papahadjopoulos D, Sawa T, Schreier H, Weiner-Kronish J, Xu Z and Gruenert DC. Expression of delta-F508 CFTR in normal mouse lung after site-specific modification of CFTR sequences by SFHR. Gene Ther. 2001;8:961-965.

【非特許文献7】Kapsa R, Quigley A, Lynch GS, Steeper K, Kornberg AJ, Gregorevic P, Austin L and Byrne E. In vivo and in vitro correction of the mdx dyst

rophin gene nonsense mutation by short-fragment homologous replacement. Hum Gene Ther. 2001;12:629-642.

【非特許文献 8】 Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami H, Oka M and Imanaka T. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR, Appl Environ Microbiol. 1997;63:4504-4510.

【非特許文献 9】 Liu L, Rice MC, Drury M, Cheng S, Gamper H and Kmiec EB. Str and bias in targeted gene repair is influenced by transcriptional activity. Mol Cell Biol. 2002;22:3852-3863.

【非特許文献 10】 Lin L, Cheng S, van Brabant AJ and Kmiec EB. Rad51p and Rad54p, but not Rad52p, elevate gene repair in *Saccharomyces cerevisiae* directed by modified single-stranded oligonucleotide vectors. Nucleic Acids Res. 2002;30:2742-2750.

【非特許文献 11】 Brachman EE and Kmiec EB. targeted nucleotide repair of cycl mutations in *Saccharomyces cerevisiae* directed by modified single-stranded nucleotides. Genetics. 2003;163:527-538.

【非特許文献 12】 Igoucheva O, Alexeev V and Yoon K. Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells. Gene Ther. 2001;8:391-399.

【非特許文献 13】 Alexeev V, Igoucheva O and Yoon K. Simultaneous targeted alteration of the tyrosinase and c-kit genes by single-stranded oligonucleotides. Gene Ther. 2002;9:1667-1675.

【非特許文献 14】 Pierce EA, Liu Q, Igoucheva O, Omarrudin R, Ma H, Diamond SL and Yoon K. Oligonucleotide-directed single base DNA alterations in mouse embryonic stem cells. Gene Ther. 2003;10:24-33.

【非特許文献 15】 Parekh-Olmedo H, Drury M and Kmiec EB. Targeted nucleotide exchange in *Saccharomyces cerevisiae* directed by short oligonucleotides containing locked nucleic acids. Chem Biol. 2002;9:1073-1084.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

前記のとおり、SFHR法は新しい遺伝子治療の形態として極めて有望である。しかしながら、現在のところSFHR法における変異遺伝子の修復効率は、用いているアッセイ系や標的遺伝子により大きくばらついているものの、多くは1%未満にとどまり、この値を飛躍的に向上させることが、SFHR法を臨床応用可能な技術とするためには不可欠である。

【0005】

この出願の発明は、以上のとおり事情に鑑みてなされたものであって、細胞内DNA配列の塩基を、より効率良く変換することのできる方法を提供することを課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

この出願は、前記の課題を解決するための第1の発明は、細胞内の標的DNA配列の1または複数個の塩基を変換する方法であって、標的DNA配列と相同であり、かつ変換すべき塩基を含む300~3,000塩基の一本鎖DNA断片を細胞内に導入することを特徴とするDNA配列の塩基変換方法である。

【0007】

この第1発明においては、一本鎖DNA断片が、標的DNA配列のセンス鎖と相同であることを好ましい態様としている。

【0008】

またこの第1発明における一つの実施態様は、その1または複数個の塩基変異によって疾患の原因となっている標的DNA配列を塩基変換することである。

【0009】

さらに第1発明における別の実施態様は、生物体内細胞の標的DNA配列の1または複数個の塩基を変換することである。

【0010】

この出願の第2の発明は、前記発明第1発明の方法によって、標的DNA配列の1または複数個の塩基が変換された細胞である。

【0011】

この出願の第3の発明は、前記第2発明の細胞を体内に保有する生物個体である。

【0012】

この出願の第4の発明は、標的DNA配列の1または複数個の塩基変異が原因となっている疾患を治療するための薬剤であって、標的DNA配列に相補的であり、かつ変換すべき塩基を含む300～3,000塩基の一本鎖DNA断片が細胞内に導入可能な形態を有する治療薬剤である。

【0013】

この出願の第5の発明は、標的DNA配列の1または複数個の塩基変異が原因となっている疾患を治療する方法であって、標的DNA配列に相補的であり、かつ変換すべき塩基を含む300～3,000塩基の一本鎖DNA断片を細胞内に導入することを特徴とする治療方法である。

【0014】

なお、この発明において「DNA配列」とはプリンまたはピリミジンが糖に β -N-グリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステル(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)が結合した分子を意味する。

【0015】

また「変換」とは、標的DNA配列の1または複数個の塩基(A、T、C、G)がそれぞれ他の塩基に置き換わること(塩基置換)、標的DNA配列の1または複数個の塩基が欠失すること(塩基欠失)、標的DNA配列に1または複数個の塩基が付加されること(塩基付加)を意味する。さらに、これらの塩基変換は、標的DNA配列の個々に独立した1または複数個の塩基が対象であってもよく、あるいは標的配列中の複数個の塩基からなる配列の置換、欠失および付加(それぞれ配列置換、配列欠失、配列付加:以下これらを「配列変換」と記載することがある)であってもよい。

【0016】

この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、薬剤の調製はRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990に、Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995等に記載されている。さらに、この発明における用語は基本的にはIUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるものであり、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。

【発明の効果】

【0017】

この出願の前記発明によれば、従来のSFHR法に比較して、高い効率で標的DNA配列の塩基または塩基配列を正確に変換することが可能となる。特に標的DNA配列のセンス鎖に相同の一本鎖DNA断片を使用することによって、熱変性した二本鎖DNA断片(PCR産物やプラスミドDNAの切断断片)を使用する場合に比較して、遙かに高い効率(約5～10倍)で標的遺伝子の目的塩基を正確に変換することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

第1発明の方法は、標的DNA配列と相同であり、かつ変換すべき塩基を含む300~3,000塩基の一本鎖DNA断片を細胞内に導入することによって、標的DNA配列の1または複数個の塩基を変換することを特徴としている。すなわちこの方法は、標的DNA配列またはその一部領域を一本鎖DNA断片により「相同置換 (homologous replacement)」することによって、標的DNA配列内の変換しようとする塩基または塩基配列 (以下「標的塩基」と記載する) を、別の塩基または塩基配列 (以下「変換塩基」と記載する) に変換することを原理としている。そして、従来のSFHR法が二本鎖DNA断片 (例えばPCR産物) を熱変性してそれぞれ一本鎖DNA断片とし、センス鎖とアンチセンス鎖の両方を標的DNA配列に作用させるのに対し、この発明の方法は、一本鎖DNA断片のみ (センス鎖またはアンチセンス鎖、好ましくはセンス鎖) を標的DNA配列に作用させることを特徴としている。

【0019】

「一本鎖DNA断片」は、変換塩基を含むことを除き、標的DNA配列と相同である。この場合の「相同」とは、二本鎖の標的DNA配列のセンス鎖およびアンチセンス鎖のいずれか一方と95%以上、好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、そして理想的には100%同一の配列であることを意味するが、標的DNA配列のセンス鎖と相同であることが、変換効率の点からは好ましい。

【0020】

またこの一本鎖DNA断片は、その端部が非修飾である。すなわち、前記の修飾オリゴヌクレオチドのように、両末端がホスホロチオエート、2'-O-Me-RNA、LNA (Locked nucleic acid) で修飾されていないDNA断片である。

【0021】

「一本鎖DNA断片のサイズ」は、標的DNA配列の長さや標的塩基の数等に応じて、300~3,000塩基の範囲から選択される。例えば、300~500塩基長、500~800塩基長、800~1200塩基長、1200~1700塩基長、1700~2300塩基長、2300~3000塩基長といったDNA断片である。

【0022】

「標的DNA配列」は、細胞内に存在するDNA配列であれば特に限定されるものではなく、ゲノム遺伝子のDNA配列、ミトコンドリアのDNA配列、プラスミドのDNA配列など、細胞内において何らかの機能を担うDNA配列を対象とすることができる。

【0023】

一本鎖DNA断片における「変換塩基」の数は、標的DNA配列における標的塩基の数に依存する。例えば個々の塩基変換 (塩基置換、塩基欠失、塩基付加) の場合には、標的DNA配列や一本鎖DNA断片のサイズに応じて、1または複数個 (2~30個程度) とすることができ、効率良く置換するためには、1~10程度が好ましい。また、配列変換の場合には、2~30程度、好ましくは2~10程度の塩基からなる配列を変換塩基とする。また一本鎖DNA断片における変換塩基の位置には特段の制限はないが、DNA断片の末端部ではないことが好ましい。

【0024】

一本鎖DNA断片は、例えば以下のように作成することができる。例えば、標的DNA配列が、塩基変異を有する配列 (例えば疾患原因となっているゲノム遺伝子DNA配列) である場合、一本鎖DNA断片は、例えば正常なゲノム遺伝子DNA配列やそのcDNAを適当な一本鎖DNAベクター (例えばファージミドDNAなど) で増幅し、酵素等により断片化して作成することが好ましい。また、周知の化学合成技術 (例えば、Carruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418; Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acid Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米国特許第4,458,066号等を参照) により、in vitroにおいて合成することもできる。その際に、短鎖 (例えば100塩基長程度) のものを個々に作成し、それらを公知のライゲーション法により連結して目的の長さ (300~3,000塩基) の一本鎖DNA断片を作成して

もよい。

【0025】

なお、DNA断片を調製する方法としては、試験管内で鋳型DNAを増幅する方法〔例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法、NASBN (Nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (Transcription-mediated amplification) 法等〕が知られているが、これらの方法の場合には、鋳型DNAと高度に一致する一本鎖DNA断片を増幅することが困難である。例えばPCR法の場合には、数百塩基に一回の確率で変異が導入されることが知られている (Takagi M, Nishioka M, Kakiyama H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami H, Okamoto M and Imanaka T. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR, Appl Environ Microbiol. 1997;63:4504-4510)。このような一本鎖DNA断片における「予想外の変異」は、例えば疾患遺伝子の修復に使用した場合、正常な塩基に新たな変異を導入する危険性があり、好ましくない。また、大腸菌プラスミドの場合には、PCR法よりも約 10^8 倍の正確さでそのインサート (二本鎖DNA断片) を増幅することができる (Drake JW. Comparative rates of spontaneous mutation. Nature. 1969;221:1132参照) が、増幅した二本鎖DNA断片を変性させて一本鎖DNA断片とした場合、センス鎖とアンチセンス鎖を分離することが困難である。従って、特にセンス一本鎖DNA断片を標的DNA配列に作用させる場合には、プラスミドDNAによる一本鎖DNA断片の作成は好ましくない (このような不都合は、PCR産物 (二本鎖DNA断片) から一本鎖DNA断片を作成する場合も同様である)。

【0026】

一方、細胞内の正常ゲノム遺伝子配列に変異を導入することによって、非天然型の細胞や動物個体 (これらの細胞や動物個体は、例えば特定の化合物等に対する感受性が正常型とは異なることによって化合物スクリーニング系として有用であり、あるいは疾患モデル細胞または疾患モデル動物等として有用である) を作出するためにも、この発明の方法を使用することができる。このような正常な標的DNA配列の1または複数個の塩基を変換するための (すなわち、人為的な変異導入のための) 1本鎖DNA断片は、市販の変異導入キット等を用いた方法や、変異導入型のPCR法等の公知の方法により作成したファージミドDNAなどから調製することができる。あるいは、前記のような化学合成技術により、*in vitro* において合成することもできる。

【0027】

細胞内に一本鎖DNA断片を導入するには、リン酸カルシウム法、リポソームや赤血球ゴーストを使用する方法、エレクトロポレーション法、ガラスピペットを用いた微量注入法等を用いることができる。

【0028】

また、一本鎖DNA断片は、生物体内に存在する細胞内に導入することができる。その場合には、適当な溶媒と混合した状態で一本鎖DNA断片を生物体内に投与する方法を採用することができる。あるいは生体認識分子を提示した中空ナノ粒子やリポソーム等により一本鎖DNA断片を包埋して生物体内に導入するようにしてもよい。また、エレクトロポレーション法を採用することもできる。

【0029】

そして、この生物体内に存在する細胞内に一本鎖DNA断片を導入する方法は、対象となる標的DNA配列が、その1または複数個の塩基変換変異によって疾患の原因となっているような「疾患原因遺伝子」の場合には、その原因遺伝子の塩基変換変異を修正することが可能となる (第5発明)。また、そのような一本鎖DNA断片を、前記のとおり「細胞内に導入可能な形態」とすることによって、遺伝子の塩基変換変異を原因とする疾患の治療薬剤となる (第4発明)。

【0030】

なお、遺伝子疾患の原因として知られている変異には、一塩基の変換だけではなく、ハンチントン舞踏病に見られるようなCAGリピートによる長鎖挿入変異 (McMurray CT. Huntington's disease: new hope for therapeutics. Trends Neurosci. 2001;24:S32-S38) や

、筋ジストロフィーのジストロフィン遺伝子における長鎖欠失変異 (Forrest SM, Cross GS, Speer A, Gardner-Medwin D, Burns J and Davies KE. Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies. Nature. 1987;329:638-640.

19. Den Dunnen JT, Bakker E, Breteler EG, Pearson PL and van-Ommen GJ. Direct detection of more than 50% of the Duchenne muscular dystrophy mutations by field inversion gels. Nature. 1987;329:640-642) のように、修復用一本鎖DNAに正確かつ長い塩基配列を必要とするような原因遺伝子も存在する。このような変異遺伝子に対しても、この発明の治療方法および治療薬剤は有効である。

【0031】

この出願の第2の発明は、前記第1発明の方法によって、標的DNA配列の1または複数個の塩基若しくは塩基配列が他の塩基または塩基配列に変換された「細胞」である。細胞の種類には特段の制限はなく、大腸菌、枯草菌等の原核細胞、酵母、昆虫細胞、動植物細胞等の真核細胞等を対象とすることができる。このように作成された細胞は、例えば、その機能遺伝子配列に1または複数個の塩基変換が導入された細胞であり、特定の機能が欠損または亢進した細胞として、例えば薬剤や生理活性物質、細胞毒性物質等のin vitroスクリーニングの材料として使用することができる。また、バイオリアクターや発酵工学等において使用する細胞について、その用途において「不都合」な特定の細胞機能を欠損させるためにも使用することができる。

【0032】

この出願の第3の発明は、前記第2発明の細胞を体内に保有する生物個体であり、特に動植物細胞等の多細胞生物である。また、この生物個体は、前記第2発明の細胞 (in vitroで塩基変換された細胞) を体内に移植された生物個体であってもよく、あるいは一本鎖DNA断片を体内に導入された結果、体内細胞の標的DNA配列の1または複数個の塩基が他の塩基または塩基配列に変換された生物個体であってもよい。このような生物個体は、例えば、その標的DNA配列の塩基置換が疾患の原因となる場合には、「疾患モデル動物」として有用である。また、様々な遺伝子を塩基変換し、薬剤成分や毒性物質をin vivoスクリーニングするなどの用途にも使用することができる。

【実施例】

【0033】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0034】

この実施例では、哺乳動物細胞および大腸菌のプロモーター下流に、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (Hyg) と緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子の融合遺伝子 (HygEGFP) を導入したプラスミドを構築し、一本鎖DNA断片による塩基置換を検討した。すなわち、標的プラスミドであるpTENHEXは、HygEGFP遺伝子のコドン34に終止変異 (Stop: TGA) が導入されているため、哺乳動物細胞および大腸菌内で正常なHygEGFP遺伝子を発現することができない。そこで、コドン34が正常型のSer (TCA) である一本鎖DNA断片 (HygEGFP遺伝子) を細胞に導入することによって、この変異HygEGFP遺伝子のコドン34を正常型のSer (TCA) に修復するか否かを、ハイグロマイシン耐性およびEGFPの蛍光発色という2種類の表現型によって確認した。

【0035】

これまでの研究において、相同な配列を持つ二組のDNAが相互作用する際、一方の二本鎖が一本鎖になることによって、他方の二本鎖へ進入することが知られている (Kowalczykowski SC. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication Trend Biochem Sci. 2000;25:156-165; Baumann P, Bensen FE and West SC. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. Cell. 1996;87:757-766.)。そこで、SFHR法の機構にこれと類似した仕組みが存在するならば、二本鎖DNAを使うよりも、あらかじめ一本鎖DNAを調製して遺伝子修復を行えば、より高い遺伝子修復効率を得られることが想定される。そこで、ファ

ージミドDNAを用いて環状一本鎖DNAを調製し、これを制限酵素で切り出して一本鎖DNA断片としたもの (fSense、fAntiS) を使用した。

【0036】

なお、比較に用いる二本鎖DNA断片は、PCR法よりも 10^8 倍の正確さを持つ大腸菌内 (Drake JW. Nature. 1969;221:11329) で複製されたプラスミドより、制限酵素を用いて二本鎖DNA断片を調製し、これを熱変性させたもの (dsHES) を使用した。

(1) 方法

(1-1) プラスミドおよびファージミド

pHygEGFP (CLONTECH Laboratories Inc., CA) のKpnI-SalI断片を、pALTER-1 (Promega Corp., WI) の同じ制限酵素部位へ導入したpALHEIに対し、Altered Sites II in vitro Mutagenesis System (Promega Corp., WI) を用いて部位特異的変異導入反応を行った。一回目の反応ではオリゴヌクレオチドXho (5'-cggcacctcgagcagcgcat-3': SEQ ID No. 1) を用いてXhoI部位を導入した (pALHEX)。このときコドン195はValからGluへ変化するが、遺伝子修復反応の定量には影響しなかった。二回目の反応では、正常HygEGFP遺伝子のコドン34に遺伝子マーカーとなるPmaCI部位を、オリゴヌクレオチドSilent (5'-gcgaagaatcacgtgctttca-3': SEQ ID No. 2) を用いて導入した (pALHEXP)。さらにpALHEXPに対し、コドン34にopal変異を導入するために、オリゴヌクレオチドOpal (5'-ggcgaagaatgacgtgtttc-3': SEQ ID No. 3) を用いた (pALHEXB)。最後の反応はopal変異と同時に、先ほど導入されたPmaCI部位が除去され、代わりに変異型HygEGFP遺伝子のマーカーとしてBmgBI部位が導入される。それぞれのHygEGFP遺伝子の配列はシーケンス反応によって確認した。pALHEXPおよびpALHEXBよりBamHI-SalI断片を精製し、NXBリンカー (Upper: 5'-catggcgatcctcga-3': SEQ ID No. 4, Lower: 5'-gatctcgaggatcg-3': SEQ ID No. 5) を用いて、pTriEx-3Neo (Novagen, WI) のCMVプロモーターおよびT7プロモーターの下流に存在するNcoI-XhoI部位へ導入した (pTENHES、pTENHEX、図1A)。ここで得られたプラスミドは、大腸菌および哺乳動物の両細胞内で、それぞれ正常型または変異型HygEGFP遺伝子を発現することができることが確認された。これらのプラスミドを大腸菌DH-5 α 株に導入し、Endofree Mega Kit (QIAGEN, CA) を用いて調製した。

【0037】

ファージミドはpTENHESのXhoI断片をpBluescript II SK+のXhoI部位に導入することによって得られた (図1B)。これによって得られるpBSHES/AntiSenseおよびpBSHES/Senseは、それぞれXhoI断片の向きがpBluescript II SK+ (Stratagene, CA) のfl oriに対し逆の向きに挿入され、このファージミドから得られる一本鎖環状DNAは、それぞれhHygEGFP遺伝子のアンチセンス配列またはセンス配列を含んでいる。それぞれの挿入方向は制限酵素NaeIおよびPmaCIによって確認した。これらのファージミドをJM105株に導入し、50 μ g/mlのアンピシリンを含む2 \times YT培地で一晚培養した後、5mlを500mlの2 \times YT培地 (50 μ g/ml Amp) に移し、激しく攪拌しながら37 $^{\circ}$ Cで培養した。1時間後に25 μ g/mlとなるようカナマイシンを加え、再び培養を続け、23時間後、遠心分離 (2.15 $\times 10^3$ g、15分) によってファージを大腸菌と分離した。上清に含まれるファージに、75mlの20%PEG6000/2.5 M NaCl溶液を加え、一晚4 $^{\circ}$ Cに静置した。遠心分離 (18.8 $\times 10^3$ g、20分) により、ファージを沈殿させた後、20mlの0.3 M AcONa/1mM EDTAに懸濁し、フェノール、フェノール/クロロフォルム (1/1)、クロロフォルムによって、環状一本鎖DNAを回収した。DNA溶液に25ml EtOHを加え、室温に15分間静置した後、遠心分離によって沈殿させ、500 μ lのH₂Oに溶解した。

(1-2) 断片の調製

pTENHES 1 μ g当たり2.5 Uの制限酵素XhoIで消化し、607bpの断片を3.5%低融点アガロースゲルによって分離した後、フェノール・クロロフォルム抽出によって回収した。また一本鎖状のpBSHES/AntiSenseおよびpBSHES/Sense 1 μ mol (1.1 μ g) に対し5 UのXhoIを用い、二本鎖と同様の操作によって、607ntの断片を回収した。環状一本鎖DNAの制限酵素処理では、XhoI部位周辺を二本鎖とするため、pBSHES/AntiSenseの5' および3' 側のXhoI部位に相同なオリゴヌクレオチドAS5' (5'-ccccctcgagatcccc-3': SEQ ID No. 6) お

よびAS3' (5'-cggcacctcgaggctcgac-3': SEQ ID No. 7)、またpBSHES/Senseの5'および3'側に対しS5' (5'-ccccctcgagggtgccg-3': SEQ ID No. 8) およびS3' (5'-ggggctctcgaggctcgac-3': SEQ ID No. 9) を、環状一本鎖に対し5モル当量、制限反応溶液に加えた。

【0038】

回収された断片は、それぞれゲルろ過 (NAP5 columns, Amersham Biosciences Ltd., Buckinghamshire, England) により精製を行い、精製度を A_{260}/A_{280} が1.8以上であることにより確認した。濃度は $1.0 OD_{260}$ を、二本鎖DNAでは $50 \mu\text{g}$ 、一本鎖では $40 \mu\text{g}$ として算出した。

(1-3) 遺伝子導入

遺伝子導入反応の前日に、4mlの10%FBSを含むD'MEM/F12 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) 中に懸濁した 3×10^5 のCHO-K1細胞を6-cmディッシュに播き、 37°C 、5% CO_2 雰囲気下において培養した。あらかじめ熱変性処理 (98°C 、5分間 $\rightarrow 0^\circ\text{C}$ 、5分間) させた2.5、5、10nmol (それぞれ 0.47 、 0.94 、 $1.9 \mu\text{g}$) の一本鎖DNAまたは10nmol ($3.8 \mu\text{g}$) の二本鎖DNAに、 $72 \mu\text{g}$ のPLUS試薬 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) を含む $149 \mu\text{l}$ のD'MEM/F12、および25fmol (125ng) のpTENHEXを加えた。さらに、N/P比の違いが遺伝子修復効率に大きな影響を及ぼすことが報告されている (Sangiulio F, Bruscia E, Serafino A, Nardone AM, Bonifazi E, Lais M, Gruenert DC and Novelli G. In vitro correction of cystic fibrosis epithelial cell lines by small fragment homologous replacement (SFHR) technique. BMC Med Genet. 2002;3:8) ため、すべてのサンプルにおいてDNA量が一定 (計 $4 \mu\text{g}$) となるよう、Amp耐性遺伝子を含まないpALTER-Ex2 (Promega Corp., WI) を適量加えた。これを20分間室温に放置した後、 $32 \mu\text{g}$ のLipofectAMINE試薬 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) を含む $141 \mu\text{l}$ のD'MEM/F12を加え、さらに20分間室温に放置し、細胞に処理する直前に $250 \mu\text{l}$ のD'MEM/F12を加えた。細胞は4mlのD'MEM/F12で洗った後、 2ml のD'MEM/F12に置換し、そこへ先に調製したDNA溶液を全量加え、 37°C 、5% CO_2 雰囲気下においてインキュベートした。6時間後、反応溶液を4mlの10%FBSを含むD'MEM/F12に置換し、導入反応を終了した。さらに42時間培養した細胞をトリプシン処理し、 1ml PBSで洗った後、遠心分離により細胞を集めた。これを $100 \mu\text{l}$ のTEG (25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 50mM Glc, pH8.0) に懸濁し、 $200 \mu\text{l}$ の0.2N NaOH/1%SDSを加え穏やかに攪拌した後、室温に5分間放置した。さらに $150 \mu\text{l}$ の8M AcONH₄を加え、 4°C で15分間冷やした。遠心分離後、isoPrOH沈殿によって、上清からプラスミドDNAを回収した。プラスミドDNAは $20 \mu\text{l}$ のH₂Oに溶解し、 -20°C に保存した。

(1-4) 遺伝子修復効率の定量

前日から 1.4ml のLB培地で培養したDH-5 α を、1サンプル当たり $125 \mu\text{l}$ とり 12.5ml の新鮮なLB培地へ移し、さらに4時間培養した。大腸菌は7.5、1、0.2mlの冷H₂Oで洗浄し、最後に約 $100 \mu\text{l}$ となるよう冷H₂Oを加え、再度懸濁させた。これを $4 \mu\text{l}$ のpDNAと共に0.1-cmギャップのキュベットへ移し、Gene Pulser II (Bio-Rad laboratories inc. CA) を用いて、 4°C 、1.8kV、25 μF 、200 Ω の条件でエレクトロポレーションを行った。プラスミドを導入したDH-5 α は、 1ml SOC培地で1時間培養した後、 $50 \mu\text{g/ml}$ Amp添加LB培地に希釈し、一晚培養した。このときDH-5 α の一部をとり、LB寒天培地に播き、コロニー数によってエレクトロポレーション効率を測定したが、大きな違いは観察されなかった。翌日得られたDH-5 α を遠心分離によって回収し、 $100 \mu\text{l}$ のTEGに再懸濁した。これに $200 \mu\text{l}$ の0.2N NaOH/1%SDSを加え穏やかに攪拌した後、さらに $150 \mu\text{l}$ Sol III (3M酢酸カリウム、11.5%酢酸)を加え、氷上に5分間放置した。遠心分離した上清をフェノール/クロロホルム (1/1) で処理し、エタノール沈殿によりプラスミドDNAを回収した。これを $20 \mu\text{l}$ のH₂Oに溶解し、このうち $1-2 \mu\text{l}$ を大腸菌BL21 (DE3) 株へエレクトロポレーションにより導入した。このとき、DH-5 α と同様の操作によって、BL21 (DE3) への形質転換を行った。形質転換後、 1ml のSOC培地を加え、 37°C で1時間培養した後、その $50 \mu\text{l}$ をとり $50 \mu\text{g/ml}$ Ampおよび $10 \mu\text{M}$ IPTGを含む 1ml のLB培地で 37°C 、3時間培養した。培養後、培地の一部を1-10倍希釈したものを $75 \mu\text{g/ml}$ ハイグロマイシンB添加LB寒天培地 (Hyg75: $50 \mu\text{g/ml}$ Amp、 $10 \mu\text{M}$ IPTG) へ、100-1000倍希釈したものをハイグロマイシンBを含まないLB寒天培地

(Hyg0: 50 μ g/ml Amp, 10 μ M IPTG) へ、それぞれ等量ずつ播き、37°Cでインキュベートした。12-24時間後、Hyg0に生えたコロニーを数え、また、26-48時間後にHyg75に生えたコロニーは、FLA2000G (FUJI PHOTO FILM Co., Ltd., Kanagawa, Japan) を用いて解析し、EGFPの蛍光 (Ex. 473nm, Em. 520nm) を発するコロニーを数えた。Hyg0で得られたコロニー数を分母に、Hyg75で得られたEGFPの蛍光陽性コロニー数を分子とすることで遺伝子修復効率を算出した。

(1-5) 遺伝子型の確認

Hyg75プレート上に得られたEGFP陽性コロニーをいくつか選び、その一部を20 μ lのH₂Oに懸濁した後、98°Cで5分間、熱処理を行った。細菌の不溶性成分を遠心分離によりペレットとし、上清2 μ lを鋳型として、rTaq DNA polymerase (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いてPCRを行った。このときプライマーとして、T7pro (5'-taatacgactcactatagg-3': SEQ ID No. 10) およびHET7 (5'-atgcctcgctccagtcatt-3': SEQ ID No. 11) を用いた。ここで得られたPCR産物は、さらに正常型HygEGFP遺伝子マーカーであるPmaCI処理および、ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いたシーケンシング反応に用いた。

(2) 結果

(2-1) 遺伝子修復反応の評価系

pTENHESおよびpTENHEX (図1A) は、それぞれ正常型、変異型HygEGFP遺伝子が組み込まれており、それぞれのコドン34はSer (TCA: PmaCI)、Stop (TGA: BmgBI) である。また一本鎖を作成するためのファージミドベクター pBSHES/AntiSenseおよび pBSHEX/Sense (図1B) は、pTENHESをXhoI処理して得られた正常HygEGFP遺伝子の一部が組み込まれており、環状一本鎖となったとき、それぞれアンチセンス配列およびセンス配列をコードする。

【0039】

pTENHESおよび一本鎖環状 pBSHES/AntiSense、pBSHES/SenseをXhoI処理して得られたDNA断片を、今後それぞれdsHES、f AntiS、f Senseと記載する。標的プラスミドpTENHEXは、dsHES、f AntiS、f Senseと共にCHO-K1細胞へ導入した。このプラスミドには、哺乳動物細胞での発現のためのCMVプロモーターおよび大腸菌内での発現のためのT7プロモーターによって、変異型HygEGFP遺伝子が支配されているため、修復反応が成功したとき両細胞からEGFPの蛍光が観察される (図2)。さらに、ハイグロマイシンBに耐性となるため、修復された遺伝子を容易に単離することができる (図3)。

(2-2) 遺伝子修復反応

CHO-K1細胞に、XhoI処理して得られたDNA断片と共に、標的であるpTENHEXを導入した。このとき、dsHESは二本鎖であるため、これまでのSFHR法と同様、細胞へ導入する直前に熱変性した。また f AntiS および f Sense は一本鎖DNAではあるが、分子内高次構造を解き、またdsHESと比較を行うために、dsHESと同様に熱変性処理を行い細胞内へ導入した。導入開始から48時間後に細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、CHO-K1細胞内で修復されたHygEGFP遺伝子が発現しているのが観察された (図2)。これらの細胞よりプラスミドを回収し、BL21 (DE3) へ形質転換することにより得られるハイグロマイシンB耐性かつEGFP陽性のコロニー (図3) を確認し、遺伝子修復効率を算出した。pTENHEXに対し400倍のモル比に相当する10nmolのDNA断片を処理したとき、二本鎖DNA断片であるdsHESでは、0.43%といった従来のSFHR法と同等の修復効率であった (図4)。これに対し、一本鎖DNA断片である f AntiS は、dsHESを越える遺伝子修復効率は示さなかったものの (0.15%)、f Senseを処理した場合、2.0%という、dsHESに対して約5倍高い遺伝子修復効率を示した (図4)。

【0040】

この解析によって得られたEGFP陽性コロニーをいくつか選び、その遺伝子配列を制限酵素PmaCI (図5) およびシーケンシング反応 (図6) によって確認した。その結果、コドン34におけるStopからSer (TGA→TCA) への配列変換が確認された。またその他の配列変換は観察されなかったことより、この方法における配列特異性が確認された。

【比較例】**【0041】**

実施例で使用したpTENHEX（コドン34に終止変異（Stop: TGA）を導入したHygEGFP遺伝子を保有するプラスミドDNA）に対して、PCR産物を用いた従来のSFHR法を行い、変異HygEGFP遺伝子の修復効率を実施例と同様に検討した。

【0042】

PCR産物（pcrHES）は、以下のプライマー1とTaqポリメラーゼ（Toyobo社製）を用いて増幅し、3'-末端をBlunting High Kit（Toyobo社製）により平滑末端化し、実施例のdsHESと同様にして3.5%低融点アガロース電気泳動により生成した。

【0043】

プライマー1: 5'-gagatccccggagccg-3'（SEQ ID No. 10）

プライマー2: 5'-gaggtgccggacttcgg-3'（SEQ ID No. 11）

結果は図3および図4に示したとおりである。PCR産物（pcrHES）は、一本鎖センスDNA断片（fSense）と比較して細胞のハイグロマイシンB耐性形質の獲得効果が低く（図3）、変換効率は0.16%であった。この値はdsHESの変換効率（0.43%）の半分以下であり、また一本鎖センスDNA断片（fSense）の変換効率（2.0%）の10分の1以下であった。

【産業上の利用可能性】**【0044】**

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、細胞内DNA配列の特定塩基または塩基配列を高効率で他の塩基または塩基配列に変換する方法が提供される。これによって、疾患遺伝子等の変異箇所を効率よく修復することが可能となる。

【図面の簡単な説明】**【0045】**

【図1】 Aは、正常型および変異型のHygEGFP遺伝子をそれぞれ組み込んだ標的プラスミドpTENHESおよびpTENHEXの構成図である。Bは、一本鎖のアンチセンスDNA断片およびセンスDNA断片を作成するためのファージミドベクターpBSHES/AntiSenseおよびpBSHES/Senceの構成図である。

【図2】 標的プラスミドpTENHEXと一本鎖センスDNA断片を哺乳動物細胞（CHO-K1細胞）に導入した場合の蛍光シグナルを観察した顕微鏡写真像である。変異型HygEGFP遺伝子が一本鎖DNA断片によって修復され、EGFP遺伝子が発現して蛍光シグナルが生じる。

【図3】 標的プラスミドpTENHEXと一本鎖DNA断片（fAntiS、fSense）、二本鎖DNA断片（dsHES）およびPCR産物（pcrHES）を導入した哺乳動物細胞（CHO-K1細胞）をハイグロマイシンB添加培地で培養した状態を測定した顕微鏡写真像である。特に一本鎖センスDNA断片（fSense）を導入した場合に、変異型HygEGFP遺伝子が修復され、細胞はハイグロマイシンB耐性形質を獲得する。

【図4】 dsHES、fAntiS、fSenseおよびpcrHESのそれぞれの細胞導入量における遺伝子修復効率を示したグラフである。

【図5】 EGFP陽性細胞から抽出した標的プラスミドの制限酵素PmaCI断片の電気泳動の結果である。

【図6】 EGFP陽性細胞から抽出した標的プラスミドの制限酵素PmaCI断片の配列分析の結果である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> A Method of Base Modification for DNA Sequence

<130> NP03454

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 1

cggcacctcg agcacgcgga t21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2

gcgaagaatc acgtgctttc a21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 3

ggcgaagaat gacgtgcttt c21

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide
<400> 4
catggcgatc ctcgal5

<210> 5
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificia

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide
<400> 5
gatctcgagg atcgcl5

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificia

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide
<400> 6
ccccctcga gatcccc17

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificia

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide
<400> 7
cggcacctcg aggtcgac18

<210> 8
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificia

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide
<400> 8
ccccctcga ggtgcc17

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide
<400> 9
ggggctctcg aggtcgac18

<210> 10
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

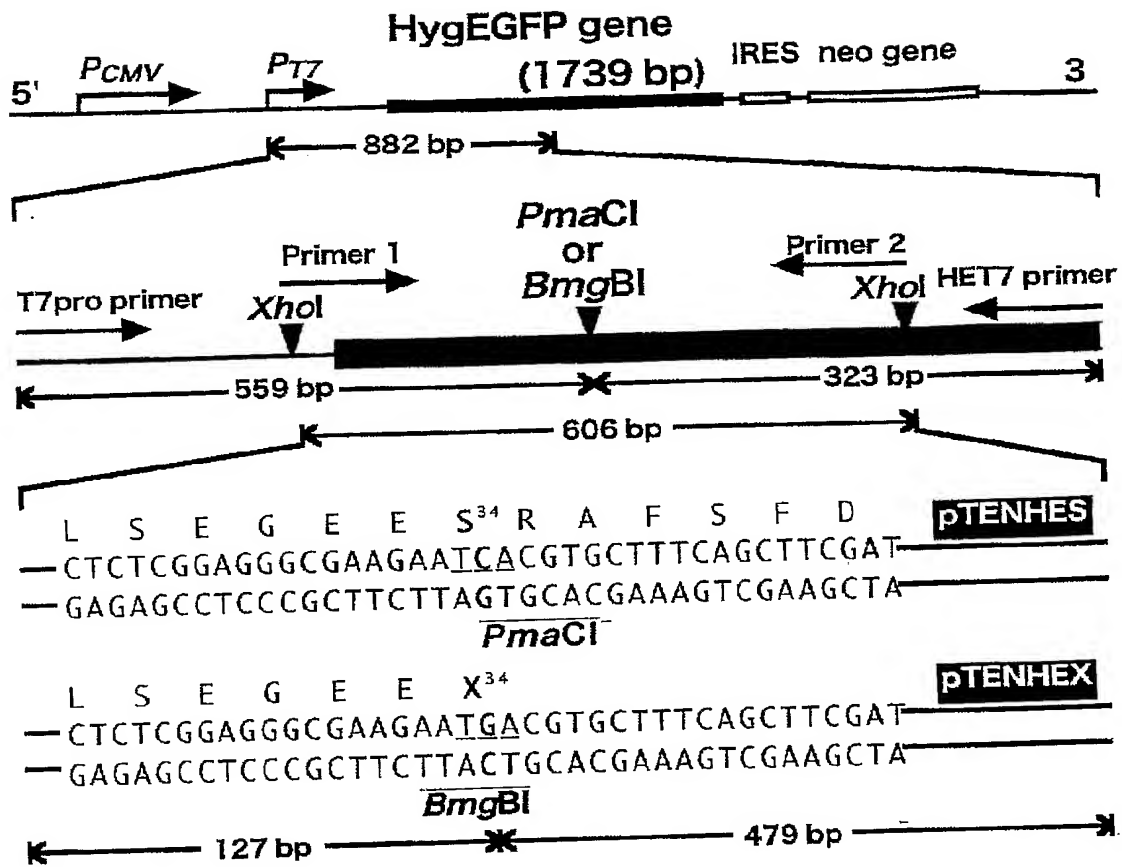
<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide
<400> 10
gagatccccg gagccg 16

<210> 11
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

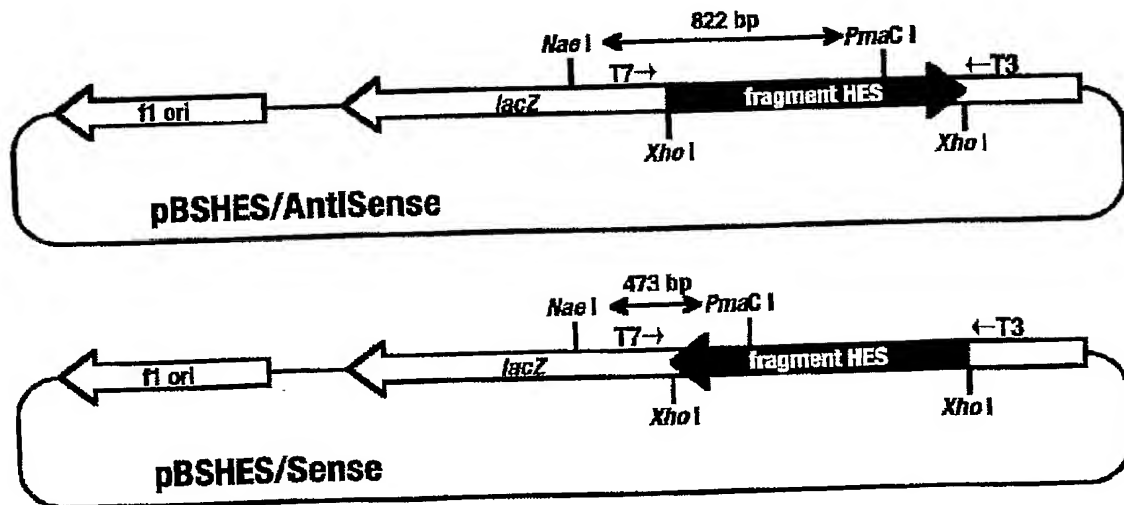
<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide
<400> 11
gaggtgccgg acttcgg 17

【書類名】 図面
【図 1】

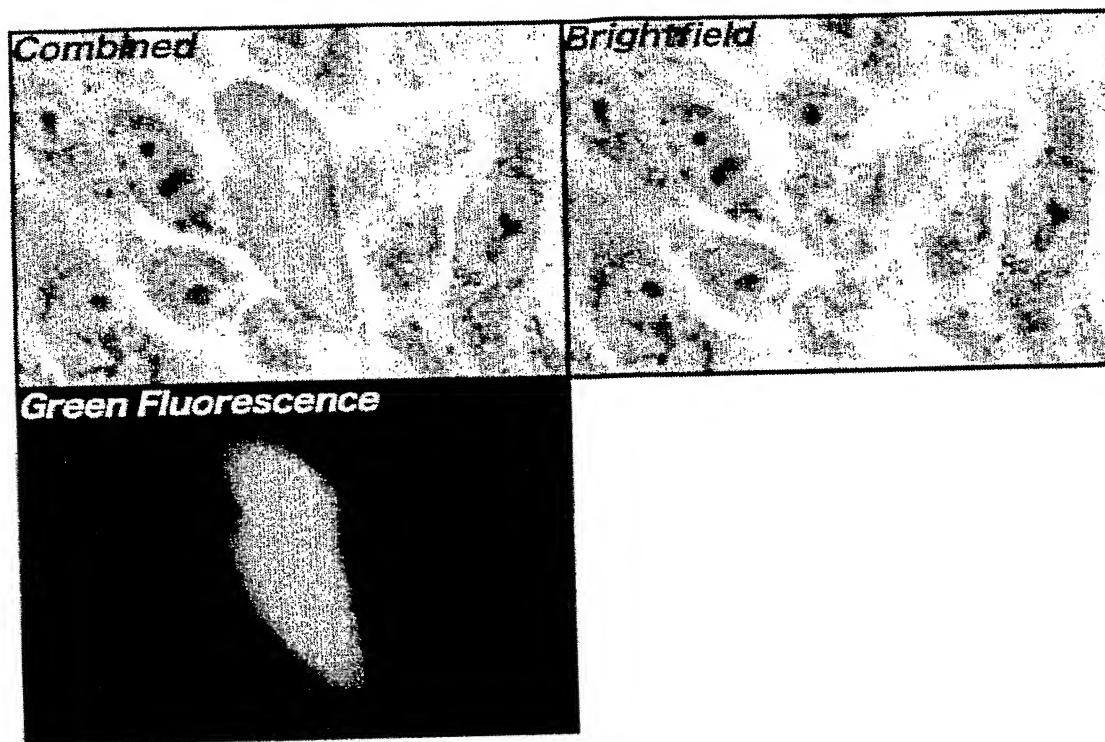
A.



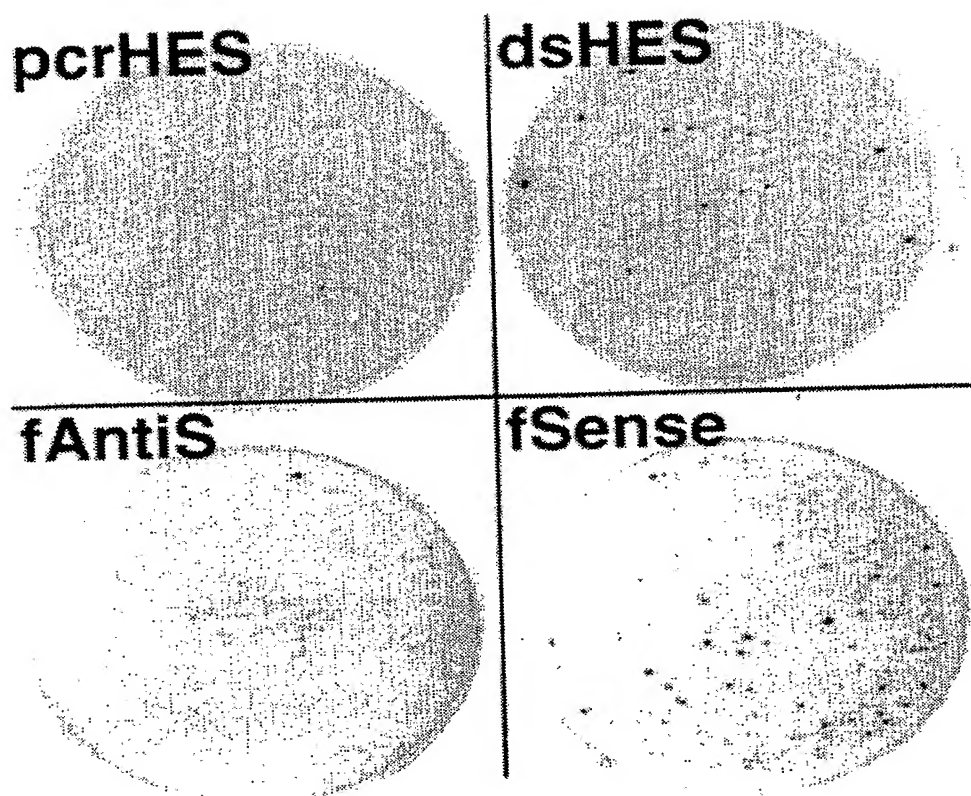
B.



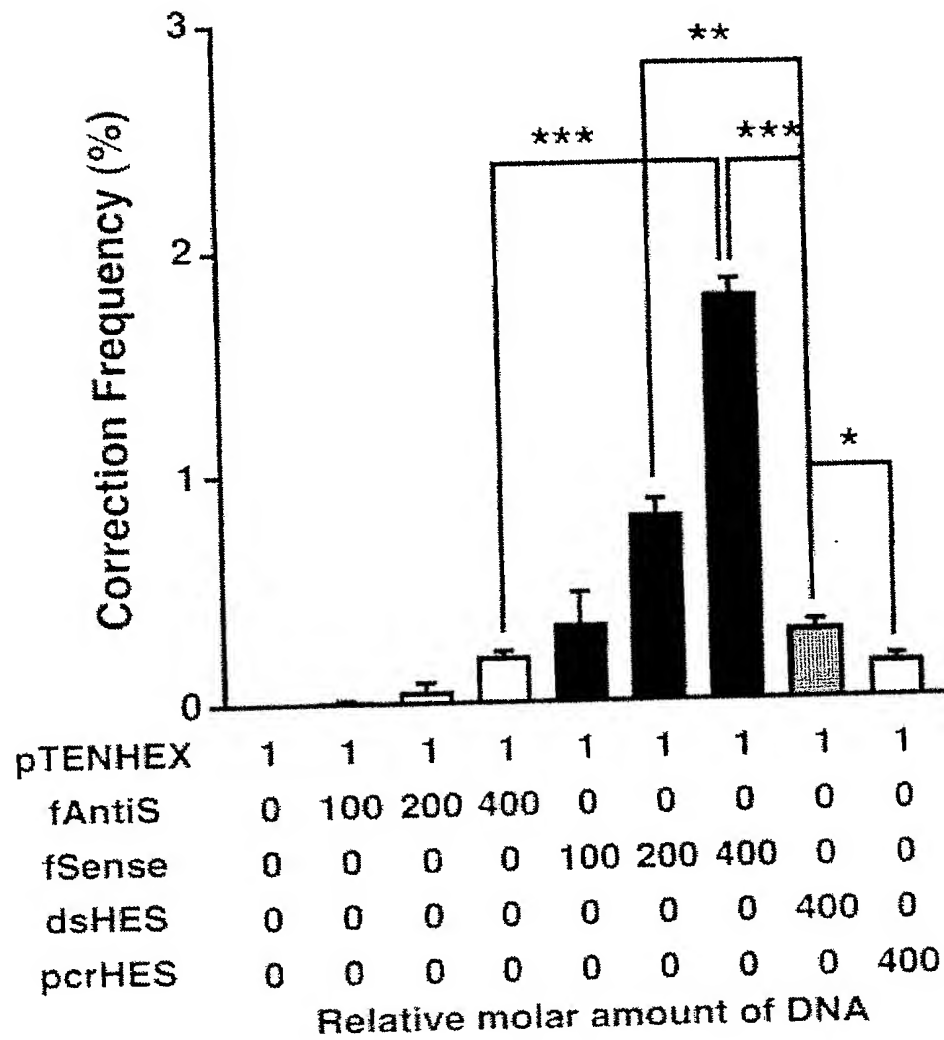
【図 2】



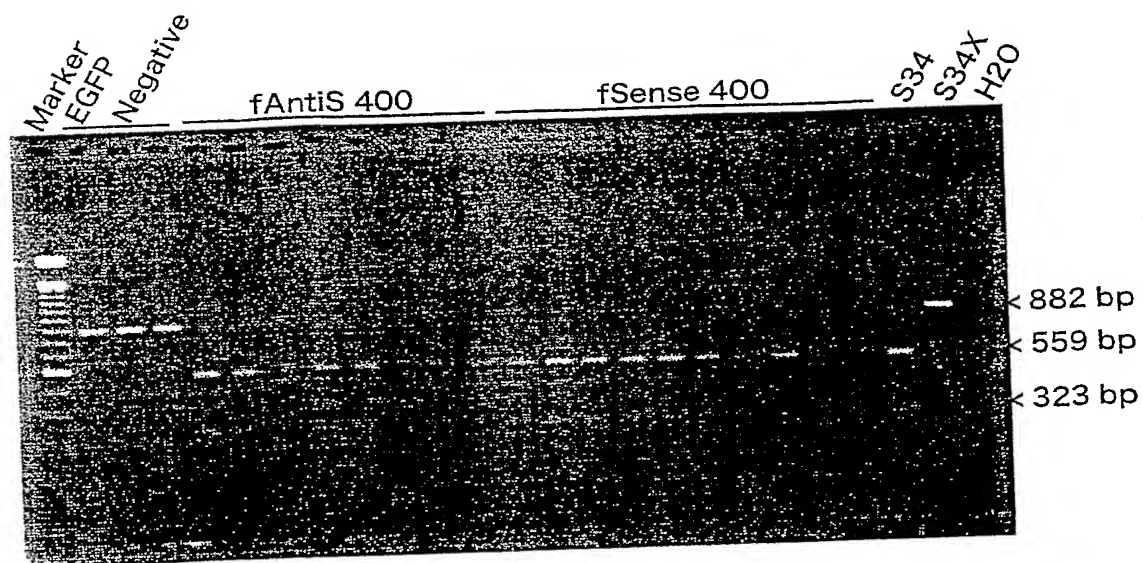
【図 3】



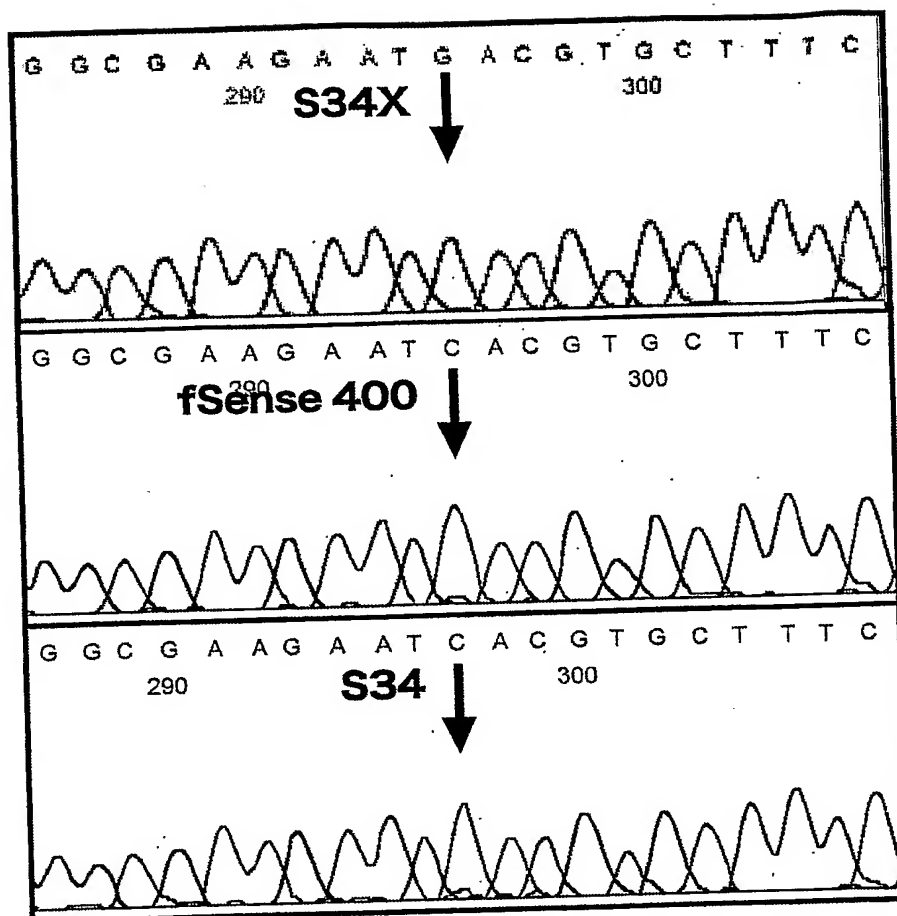
【図 4】



【図 5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 細胞内DNA配列の特定塩基を高効率で他の塩基に変換する方法を提供する。

【構成】 細胞内の標的DNA配列の 1 または複数個の塩基を変換する方法であって、標的DNA配列と相同であり、かつ変換すべき塩基を含む300～3,000塩基の一本鎖DNA断片を細胞内に導入する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 3 4 0 1 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構

2. 変更年月日

2 0 0 4 年 4 月 1 日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人科学技術振興機構